

横断山地区海仙报春的谱系地理学研究*

宋敏舒^{1,2}, 乐霁培², 孙航², 李志敏^{1**}

(1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650092; 2 中国科学院昆明植物研究所
生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 由于横断山地区特殊的地理效应, 第四纪冰期气候的反复变化对该地区植物的地理分布和居群遗传结构产生重要影响。为了揭示该地区分布的物种的谱系地理结构, 检测了该地区特有的、生于湿地环境的植物海仙报春 (*Primula poissonii*) 的叶绿体 *trnL-F* 和 *trnT-L* 两个序列变异。共对 13 个居群 167 个个体的两个叶绿体片段进行测序, 共发现 11 个单倍型。三种单倍型被共享, 其他单倍型都只存在于单个居群内。分子变异分析 (AMOVA) 结果表明分布区内海仙报春的遗传变异主要存在于居群间 (99.08%), 且居群间的遗传分化很高 ($G_{ST}=0.916$, $F_{ST}=0.99077$, $N_{ST}=0.973$), 有着极显著的谱系地理学结构 ($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.01$) 和较低的居群间平均基因流 ($N_m=0.08$)。结合嵌套分支分析 (NCA), 本文的研究结果推测该物种在冰期可能存在多个避难所, 并没有表现出大多数温带植物在第四纪冰期所经历过的种群集体扩张和迁移的现象, 异域片段化被认为是该物种现有单倍型分布格局形成的主要原因。海仙报春的谱系地理结构是气候的反复波动和横断山特殊的地理环境互相作用的结果。

关键词: 横断山; 海仙报春; 谱系地理学; 叶绿体 DNA; *trnL-F*; *trnT-L*

中图分类号: Q 16, Q 948

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2011)01-091-10

Phylogeographical Study on *Primula poissonii* (Primulaceae) from Hengduan Mountains*

Min-Shu SONG^{1,2}, Ji-Pei YUE², Hang SUN², Zhi-Min LI^{1**}

(1 School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; 2 Key Laboratory of Biodiversity
and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The topological effect of the Hengduan Mountains (HM) during the Quaternary climatic oscillation must have important effects on spatial distribution and genetic structure of plants distributed there. In this study, we examined the chloroplast *trnL-F* and *trnT-L* sequence variation of *Primula poissonii*, a relatively common alpine perennial endemic to this region. Eleven haplotypes were detected by analyzing 167 individuals from 13 populations of this species. Only three of them are commonly shared while the others are respectively fixed in the single population. An analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *P. poissonii* showed that the genetic variation mainly resided among populations (99.08%), and the estimates of interpopulation differentiation were very high ($G_{ST}=0.916$, $F_{ST}=0.99077$, $N_{ST}=0.973$). Further, a highly significant phylogeographic structure was present ($N_{ST}>G_{ST}$, $P<0.01$) whereas the value of average gene flow was low ($N_m=0.08$) in the entire geographical range. Along with the nested clade analysis (NCA), our results indicate there were multiple refugia for this species during the glacial stages. We failed to detect the interglacial or postglacial range expansion in this species as commonly revealed for the other temperate plants. The nested clade analysis indicated that allopatric fragmentation was likely the major processes that

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (40930209), 云南省自然基金重点项目 (2008CC013)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: lizhimin_vip@163.com

收稿日期: 2010-12-23, 2011-01-07 接受发表

作者简介: 宋敏舒 (1986-) 女, 硕士生, 主要从事植物谱系地理学研究。

shaped the present spatial distribution of haplotypes in this species. The special phylogeographic structure of *P. poissonii* may have resulted from a combination of both climatic oscillation and complex topology of HM.

Key words: Hengduan Mountains; *Primula poissonii*; Phylogeography; Chloroplast DNA; *trnL-F*; *trnT-L*

横断山位于青藏高原东南部,通常为四川、云南两省及西藏自治区东部一系列南北向山脉的总称,其山岭海拔 2 000 ~ 6 000 m,岭谷高差一般在 1 000 ~ 2 000 m 以上(施雅风等, 1998)。横断山地区地形复杂,多数地区存在纵向平行的山脉及被其分隔而成的河谷,从而使其生境强烈斑块化。该地区的是全球生物多样性的热点地区之一(Boufford and van Dijk, 2004),植物区系十分丰富,据研究与统计约有 189 科、1 500 属和 8 590 种,其中 2 783 种为该地区特有(李锡文和李捷, 1993; Zhang 等, 2009; Zhang and Sun, 2010)。研究表明,第四纪时期这一地区经历了 4 次大的冰期和间冰期作用,每次冰期和间冰期的作用都对这一地区南北成分融汇交流产生了深远的影响,进而使之成为现代温带和高山植物区系的中心(刘淑珍等, 1986; Wu, 1988),是许多重要的植物类群尤其是高山植物如杜鹃花属(*Rhododendron*)、龙胆属(*Gentiana*)虎耳草属(*Saxifraga*)、风毛菊属(*Saussurea*)及报春花属(*Primula*)等世界性大属的现代分布中心(吴征镒, 1979, 1980, 1987; 王文采, 1992; 李锡文和李捷, 1993)。尽管我国在冰期并没有像欧洲、北极或者北美那样发生大规模的冰盖,但是在青藏高原地区这种气候波动影响了植物的分布范围,使其随冰期气候的波动发生进退。青藏高原的隆升和第四纪冰川造成的巨大的环境变化不仅改变了植物分布格局,而且也改变了物种种内的遗传结构(王献溥和刘玉凯, 1994; 孙航, 2002; Wang 等, 2005; Liu 等, 2006; Zhang 等, 2005)。同时,吴征镒(1980, 1987)提出横断山地区是第四纪冰期北温带植物的避难所,冰期后成为现代北温带植物的重要起源地和辐射地之一。

依托分子生物学技术建立起来的谱系地理学(Phylogeography)主要是通过直接检测物种不同居群 DNA 变异和谱系分析来探讨该物种曾经发生的种群扩散以及迁移路线,从而进一步推测该物种当前分布格局的历史成因,特别是能揭示出由于受第四纪冰期与间冰期反复交错的历史事件

影响。利用这种手段将有助于了解横断山地区植物分布格局以及可能存在的冰期避难所(Cheng 等, 2005; Ikeda and Setoguchi, 2007; Meng 等, 2007; Wang 等, 2009)。DNA 测序技术是目前谱系地理学研究中运用最广泛的技术之一,而植物谱系地理学研究主要集中研究叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA) 片段,该基因组具有分子量小、单亲遗传、多拷贝、结构简单及碱基序列重组少等特点,有利于遗传分析。叶绿体基因的非编码序列不仅适用于分子系统学,同样适用于种内的谱系地理学研究(Schaal 等, 1998),并且由于 cpDNA 的单亲遗传使得其基因组在揭示种群范围变化及种群的历史动态方面非常有用(Newton 等, 1999; Schaal 等, 1998),尤其有利于揭示因为环境变化或冰期影响下的种群的变化及动态(Bartish 等, 2006; Petit 等, 2003; Okaura and Harada, 2002; Fujii 等, 2002; Newton 等, 1999)。目前该领域的研究主要集中在北美及欧洲,Beheregaray (2008) 的综述表明,近 20 年的谱系地理研究文献有 77% 涉及北美洲及欧洲的研究,主要是关于第四纪冰期避难所及冰期后种群扩张的研究,而中国西南山区及喜马拉雅地区属于研究较为薄弱的地区。近年来在横断山及青藏高原地区的谱系地理学研究上取得了不错的进展,如祁连圆柏(*Juniperus przewalskii* Kom, Cupressaceae)(Zhang 等, 2005),青海云杉复合体(*Picea likiangensis* Complex, Pinaceae)(Meng 等, 2007)和露蕊乌头(*Aconitum gymnantrum*, Ranunculaceae)(Wang 等, 2009)等类群的研究揭示了中国-喜马拉雅地区的末次冰期存在多个避难所,这些类群通过改变它们的分布区域来响应第四纪气候的波动。而对条纹狭蕊龙胆(*Metagentiana striata*, Gentianaceae)(Chen 等, 2008),偏花报春(*Primula sencudiflora*, Primulaceae)(Wang 等, 2008)等草本类群的研究表明,横断山地区是第四纪冰期的避难所。

本研究所用的材料海仙报春(*Primula poissonii* Franch.)隶属于报春花属灯台报春组(sect. *Pro-*

liferae), 多年生草本, 生于海拔 2 100 ~ 3 500 m 的山坡草地湿润处和水边, 该种植物主要在横断山区的南部和东部 (四川西部和云南西北部) 分布, 是典型的异花授粉植物。由于草本植物较短的生活周期以及对生活环境变化的敏感性, 加上该种特殊的湿地生境, 所以十分适合作为横断山区的一个模式种来研究高山植物的谱系地理学。在本研究中, 我们选取了 cpDNA 的两个非编码片段 *trnL-F* 及 *trnT-L* 对海仙报春 13 个居群 167 个个体测序, 进行谱系地理学研究, 主要目的是通过初步取样的研究, 揭示该植物单倍型的地理分布式样、居群遗传结构以及冰期时的避难所及冰期后的迁移路线。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究材料采自四川西部及云南西北部, 按居群采样标准对海仙报春所处地理分布范围进行取样, 即每个居群随机采样 7 ~ 15 个个体, 每个居群内采样个体之间至少间隔 10 m, 共取得海仙报春 13 个居群 167 个个体 (表 1, 图 1)。野外采集生长良好, 无病斑的幼叶, 用硅胶快速干燥后带回实验室。凭证标本存于中国科学院昆明植物研究所标本馆 (KUN)。选取同组的亲缘种玉山灯台报春 (*Primula miyabeana*) 作为外类群。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

采用改进的 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1987) 从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA, 对 cpDNA 的 *trnL-F* 片段和 *trnT-L* 片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系在 20 μ L 体积中进行, 包括模板 DNA 10 ~ 40 ng, 2 μ L 10 $\times$ PCR 反应缓冲液, 1.6 μ L MgCl₂ (25 mmol $\cdot$ L⁻¹), 1.6 μ L dNTP 混合液 (10 mmol $\cdot$ L⁻¹), 正反引物各 1 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹), Taq DNA 聚合酶 0.5 单位。反应程序如下: 先 94 $^{\circ}$ C 条件下变性 4 min, 而后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 34 次, 最后在 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 7 min。扩增得到的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖胶上电泳, 在 ABI 3700 DNA analysis system 测序仪上测序。

1.3 数据分析

对 167 个个体的 PCR 扩增片段的全序列测序, 用 CLUSTAL_X 1.81 (Thompson 等, 1997) 软件对测定的序列进行对位排列, 并加以手工校对。用 DnaSP 4.0 (Rozas 等, 2003) 程序确定 cpDNA 单倍型。根据每个居群内不同单倍型的个体数目和总的个体数来计算单倍型频率, 然后基于每个居群的单倍型组成、不同单倍型在每个居群的个体数目和单倍型序列变异位点, 分别计算它们的遗传多样性 H_s 和 H_r (分别为居群内和居群间平均遗传多样性) 以及居群遗传分化 G_{ST} (Raymond and Rousset, 1995) 和 N_{ST} 值, 依照 Pons 和 Petit (1996) 所描述的方法, 用 PERMUT 软件计算。居群间的 N_{ST} 值用 1000 次置换进行置换检验。

表 1 海仙报春 13 个居群材料来源及叶绿体 DNA 单倍型 (H1-H11) 的遗传多样性 (Hd) 组成和频率

Table1 Origin of materials, measurements of haplotypes diversity (Hd) and composition/frequency from cpDNA haplotypes (H1-H11) in 13 populations of *P. poissonii*

编号 No.	居群 Population	采集地 Locality	样本数 Sample size	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)	单倍型数目 Haplotype number	单倍型多样性指数 H_d	核苷酸多样性指数 π
1	JL	四川九龙 Jiulong, Sichuan	13	101 $^{\circ}$ 23'	29 $^{\circ}$ 50'	2695	H5 (13)	0	0
2	MN	四川冕宁 Mianning, Sichuan	15	102 $^{\circ}$ 12'	28 $^{\circ}$ 39'	3357	H8 (15)	0	0
3	ML-A	四川木里 Muli, Sichuan	7	101 $^{\circ}$ 10'	28 $^{\circ}$ 04'	2985	H5 (7)	0	0
4	ML-B	四川木里 Muli, Sichuan	8	101 $^{\circ}$ 18'	28 $^{\circ}$ 00'	3100	H7 (8)	0	0
5	WS	云南翁上 Wengshang, Yunnan	15	99 $^{\circ}$ 45'	28 $^{\circ}$ 15'	3675	H9 (15)	0	0
6	ZD	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	15	99 $^{\circ}$ 52'	28 $^{\circ}$ 07'	3460	H1 (15)	0	0
7	WX	云南维西 Weixi, Yunnan	15	99 $^{\circ}$ 16'	27 $^{\circ}$ 19'	2897	H10(14), H11(1)	0.133(0.11)	0.0001
8	XZD-A	云南小中甸 Xiaozhongdian, Yunnan	13	99 $^{\circ}$ 47'	27 $^{\circ}$ 34'	3256	H1 (13)	0	0
9	XZD-B	云南小中甸 Xiaozhongdian, Yunnan	15	99 $^{\circ}$ 46'	27 $^{\circ}$ 35'	3367	H10(6), H1(9)	0.514(0.06)	0.00039
10	EY	云南洱源 Eryuan, Yunnan	15	99 $^{\circ}$ 59'	26 $^{\circ}$ 20'	2301	H1 (15)	0	0
11	LJ	云南丽江 Lijiang, Yunnan	14	100 $^{\circ}$ 11'	26 $^{\circ}$ 59'	2943	H6 (14)	0	0
12	KM	云南昆明 Kunming, Yunnan	8	102 $^{\circ}$ 37'	25 $^{\circ}$ 03'	1925	H2(7), H3(1)	0.250(0.18)	0.00038
13	JD	云南景东 Jingdong, Yunnan	15	101 $^{\circ}$ 01'	24 $^{\circ}$ 32'	3349	H4 (15)	0	0
Total			167					0.791(0.02)	0.00305

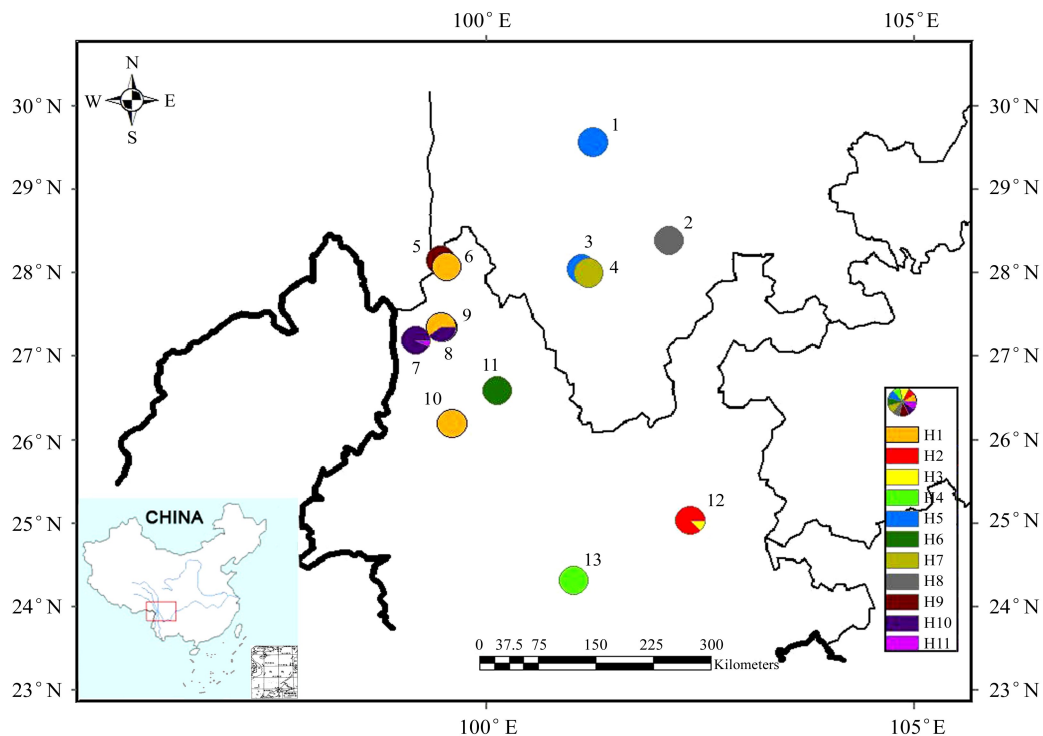


图 1 海仙报春居群采样点及叶绿体 DNA 单倍型分布图, 居群编号 (1~13) 与表 1 的编号一致

Fig. 1 The sampled locations and distribution of cpDNA haplotypes within and among populations of *P. poissonii*.

All of the population codes from 1 to 13 are accordant with Table 1

应用 ARLEQUIN 软件包 version 3.01 (Excoffier 等, 2006) 中的 AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 分析方法分别检测材料在分布区内居群内和居群间的遗传变异水平, 以及单倍型分布的 F_{ST} 评价 (Weir and Cockerham, 1984), 以进一步分析居群的分化程度 (1000 次置换检验)。

应用 PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) 软件用最大简约性分析法 (maximum parsimony, MP) 进行单倍型系统发育分析, 以亲缘种玉山灯台报春 (*P. miyabeana*) 作为外类群, 空位 (gap) 作为缺失处理, 采用启发式搜索, 1000 次随机加入序列, TBR 枝长交换, 每步保留 10 棵树。得到的一致性系统树分支的可靠性使用“靴带” (Bootstrap) 分析, 用 1000 次重复来检验单倍型各分支的支持率值。

种内单倍型间嵌套分支分析 (NCA) 参考 Templeton 等 (1992) 的方法, 利用 TCS version 1.2 (Clement 等, 2000) 软件进行构建。这种方法应用溯祖理论 (Coalescent theory) 来推测单倍型间的亲缘关系。当网状图中间出现了闭合环状结构时, 我们使用基于溯祖理论的一种方法和原则进行解释 (Crandall and Templeton, 1993; Templeton and Sing, 1993)。单倍型间的地理相关性首先用 Templeton 和 Sing (1993) 在嵌套范围内对采样地点的置换分支类型进行嵌套可能性检测的方法进行评估, 然

后从采样地点之间的地理距离计算 Clade distance (D_c) 和 Nested clade distance (D_n)。 D_c 是同一单倍型 (分支) 的个体与此单倍型分布地理中心的平均地理距离; D_n 是同一单倍型 (分支) 的个体与上一层分支地理中心的平均地理距离。在嵌套分支范围内没有地理联系的零假设用 Geodis 2.5 (Posada 等, 2000) 软件进行分析。通过比较末端分支 (tip clade, 位于网状进化树边缘、只与一个单倍型相连的分支, 简称 T) 与内部分支 (interior clade, 位于网状进化树内部、与多个单倍型相连的分支, 简称 I) 的 D_c 和 D_n 观测值、或在嵌套分支范围内用 1000 次 Monte Carlo 置换的零分配对采样地点的内部-末端分支 (interior-tip clade, I-T) 的 D_c 和 D_n 比较时进行检测。如果内部与末端的 D_c 和 D_n 差异不显著, 零假设不能被推翻, 表明居群之间没有地理相关性; 如果内部与末端的 D_c 和 D_n 差异显著, 零假设被推翻, 表明居群之间存在地理相关性, 则需要进一步推断居群之间的谱系地理关系。Templeton (2004) 的检索表用于推断单倍型变异之间的可能的时空联系。

物种水平上的居群间的平均基因流 (N_m)、单倍型多样性指数 (H_d)、核苷酸多样性指数 (π) (Nei, 1987) 以及 Tajima's D (Tajima, 1989)、Fu 和 Li's D^* (Fu and Li, 1993) 两种无限突变位点模型的中性检验方法检测及失配分

析, 又称歧点分布 (Mismatch distribution) 分析 (Rogers and Harpending, 1992) 都在 DnaSP 4.0 程序中完成。

2 结果

2.1 序列变异

对 13 个居群 167 个个体进行了叶绿体非编码 DNA *trnL-F* 和 *trnT-L* 片段的全序列测定, 通过排序发现, *trnL-F* 片段长度为 940 ~ 946 bp, *trnT-L* 片段长度为 448 ~ 460 bp, 两片段联合长度 1 406 bp, 共检测到 11 个单倍型 (H1-H11)。这 11 种单倍型变异位点见表 2。

2.2 多样性指数、遗传结构分析及失配分析

在海仙报春的 13 个居群总的单倍型多样性指数 H_d 为 0.791 (0.023), 核苷酸多样性指数 π 为 0.00305。其中单倍型 H1 的频率最高, 有 52 个个体拥有此单倍型。每个居群的遗传多样性 (H_d)、单倍型数量、单倍型组成及频率见表 1, 单倍型的地理分布情况见图 1。

通过 PERMUT 程序计算得出海仙报春居群内平均遗传多样性 H_s 值、总的遗传多样性 H_T 值、居群间遗传分化 G_{ST} 和 N_{ST} 值分别为: 0.078 (0.0445)、0.925 (0.0431)、0.916 (0.0500) 和 0.973 (0.0172)。使用 U-统计方法对海仙报春整个分布区单倍型变异的地理结构进行检验后发现 N_{ST} 极显著的大于 G_{ST} ($U=1.95$, $P<0.01$), 表明在海仙报春分布范围内, 居群间的遗传分化水平

很高 ($G_{ST}=0.916$), 并且有着明显的谱系地理学结构出现。分子变异分析 (AMOVA) 的结果表明, 居群间的遗传变异为 99.08%, 而居群内的遗传变异为 0.92%, $F_{ST}=0.99077$ ($P<0.001$) (表 3), 进一步揭示了海仙报春的遗传变异主要存在于居群间, 而且具有较高的居群分化水平。通过 DnaSP 4.0 程序计算得出居群间的平均基因流为 0.08, 说明居群间基因交流不频繁。在种的水平上对叶绿体 DNA 进行的失配分析, 得到的失配曲线为多峰曲线 (图 2), 背离了对快速扩张模型的假设, 这个结果在两种基于无限位点

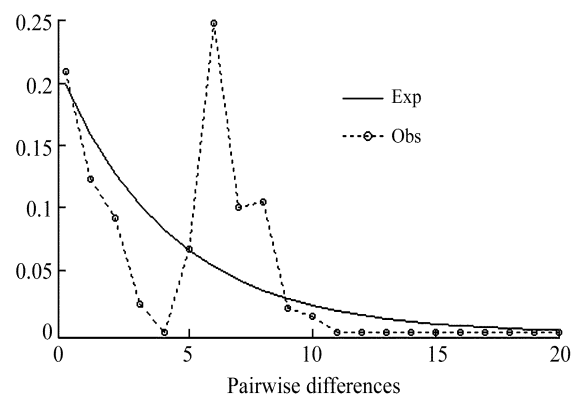


图 2 海仙报春所有个体叶绿体 DNA 两个片段联合数据的失配分析

Fig.2 Mismatch distribution for sequences data of two cpDNA fragment from all individuals of *P. poissonii*. The thin represents the expectation; The dotted line represents the observed value

表 2 海仙报春 2 个叶绿体片段 11 个单倍型间的序列变异位点

Table 2 Variable sites of the aligned sequences of two chloroplast DNA fragments in 11 haplotypes of *P. poissonii*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable Sites																			
	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	4	5	7	7	7	8	8	8	9
H1	C	G	-	C	C	T	T	-	-	C	G	C	▲ ₄	-	G	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H2	T	C	-	T	C	C	T	-	-	C	G	C	▲ ₄	▲ ₅	A	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H3	T	C	-	C	C	C	T	-	-	C	G	A	▲ ₄	▲ ₅	A	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H4	T	C	-	C	C	C	T	-	-	C	G	C	▲ ₄	▲ ₅	A	▲ ₆	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H5	C	C	-	C	T	C	T	-	-	C	A	C	▲ ₄	-	G	-	-	T	A	▲ ₄
H6	C	G	-	C	C	T	T	-	▲ ₃	C	G	C	▲ ₄	-	G	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H7	T	C	▲ ₁	C	T	C	T	-	-	C	A	C	-	-	G	-	-	T	C	-
H8	C	C	-	C	C	C	T	-	-	T	G	C	▲ ₄	▲ ₅	A	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H9	C	G	-	C	C	T	T	-	-	C	G	C	▲ ₄	-	G	-	▲ ₇	C	A	▲ ₄
H10	C	G	-	C	C	T	A	▲ ₂	-	C	G	C	▲ ₄	-	G	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄
H11	T	G	-	C	C	T	A	-	-	C	G	C	▲ ₄	-	G	-	▲ ₇	A	A	▲ ₄

▲₁, TATTGG; ▲₂, TTCTATGAA; ▲₃, GAAGA; ▲₄, AGTTTATTT; ▲₅, TATTTA; ▲₆, AAAC; ▲₇, CTTTTTGA; -, delete

表 3 所有单倍型 AMOVA 分析
Table 3 Analyses of molecular variance (AMOVA) for all haplotypes

变异来源 Source of variation	自由度 df	方差 SS	变异成分 VC	变异比例 Variatioin (%)
居群间 Among population	12	1471.771	9.58204	99.08
居群内 Within population	154	13.750	0.08929	0.92
总计 Total	166	1485.521	9.67132	
固定指数 Fixation index F_{ST}	0.99077 ($P<0.001$)			

非重组模型的中性检验 Tajima's $D=0.94711$ ($P>0.10$)、Fu and Li's $D=1.10072$ ($P>0.10$) 中得到了支持,中性检验结果均为正值显示我们所采样的海仙报春种群由于长期的地理隔离增加了居群间的分歧。

2.3 各单倍型的之间的系统发育和嵌套分析 (NCA)

用 PAUP 软件分析 11 个单倍型,以玉山灯台报春为外类群进行系统发育分析。最大简约性 (MP) 分析,序列矩阵中有 26 个变异位点,其中 10 个信息位点,得到一棵严格一致性树 (图 3)。从严格一致性树看出,海仙报春 13 个居群的 11 个单倍型分化为 3 个主要分支:分支 I 包括单倍型 H1、H6、H9、H10 及 H11,分别固定在云南西北部的 ZD、WS、WX、XZD、EY 及 LJ;分别固定在 ML 两个居群和 JL 居群的单倍型 H5 和 H7 以较高的支持率 (97%) 聚为分支 II,分支 III 由单倍型 H2、H3、H4、H8 组成,分别固定在 KM、JD 及四川西部的 MN 居群。用 TCS1.2 软件构建了单倍型间的最小生成网状图并进行了分层次的嵌套进化分支分析 (图 4),其分布格局与最简约树基本一致。11 个单倍型组成了 7 个一级分支 (1-step clades), 5 个二级分支 (2-step clades), 3 个三级分支 (3-step clades)。Clade3-1 包括 2 个二级分支和 2 个一级分支,固定在 ML 和 JL 两地的 3 个居群中; Clade2-4 包括 2 个一级分支 Clade1-4 和 Clade1-5,由云南西北部的 ZD、WX、XZD-A、XZD-B、EY、LJ 6 个居群拥有的单倍型组成; Clade2-5 的上级分支为 Clade3-3,也包括 2 个一级分支 Clade1-6 和 Clade1-7,分别由 KM、JD 及 MN 所拥有的单倍型组成。检索表分析推测得到的各个支系单倍型地理分布格局的一系列历史成因见表 4: 整个支系和各个支系的形成原因均为

异域片段化 (Allopatric fragmentation)。

3 讨论

从图 3 可以看出 11 种单倍型可以分为地理范围各不相同的 3 个分支, Clade-I 分布于云南西北部, 其中单倍型 H1 被相邻的 4 个居群 (中甸、小中甸-A、小中甸-B 及洱源) 分享, 网状进化树支持其可能为这个分支的祖先单倍型, 这一分支的其他单倍型都通过较小的突变从这个祖先单倍型衍生出来, 并且固定在不同的地区; Clade-II 仅仅分布于四川西部的木里-A、木里-B 及九龙居群, 从网状进化树的结果看来, 这个分支经过了较多的突变从 Clade-I 中分化出来, 表

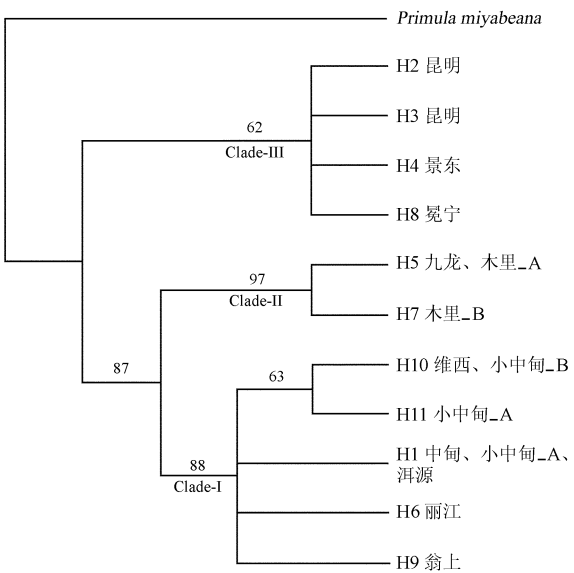


图 3 海仙报春 11 种单倍型 (H1 ~ H11) 的 1 棵最大简约 (MP) 树, 分支上的数字表示简约性分析 1000 次重复得到的靴带分析支持率 (BS), 单倍型的地理分布情况标在各单倍型后
Fig.3 The most parsimonious (MP) tree based on eleven cpDNA haplotypes (H1-H11) of *P. poissonii*, numbers above the branches indicate MP bootstrap values (BS) based on 1000 replicates, and geographical distribution of each haplotype was marked out respectively

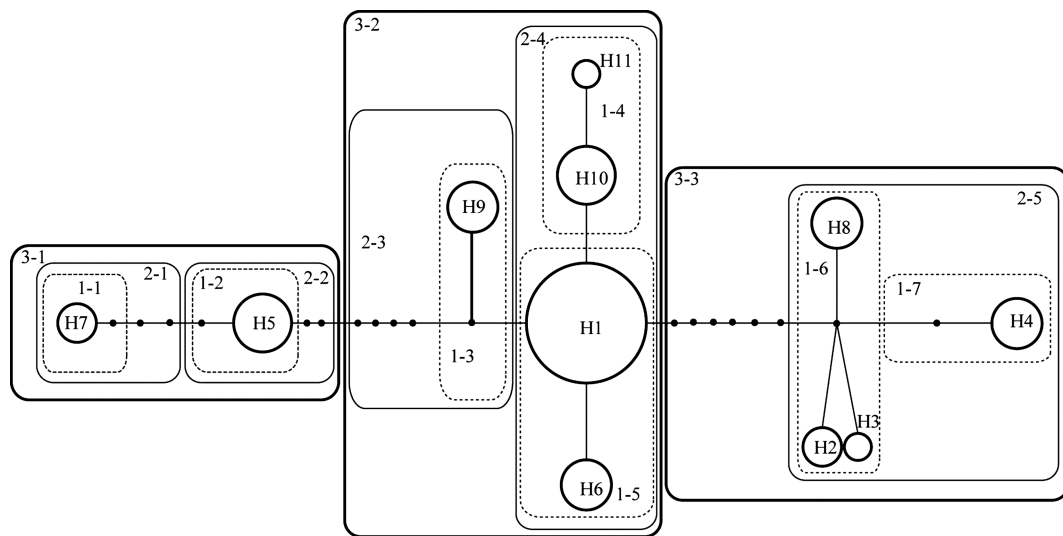


图4 海仙报春两个叶绿体 DNA 序列联合分析的 11 个单倍型网状进化树
圆圈中或周围的数字 (H1 ~ H11) 表示单倍型, 圆点表示假定的单倍型, 每一分支表示一次突变

Fig. 4 Nested cladogram of 11 haplotypes based on two cpDNA sequences of *P. poissonii*

Cycles with numbers (H1-H11) denote haplotype. Dots represent putative haplotypes. Each branch represents one mutation

表4 基于对海仙报春叶绿体 DNA 单倍型数据的嵌套分支分析结果, 应用 Templeton (2004) 的检索表分析得到的一系列推论

Table 4 Chain of inference from the nested clade analysis of the cpDNA haplotypes data of *P. poissonii* using Templeton's (2004) inference key

分支 Clade	检索 Clade key	推论 Inferences
1-4	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation
1-5	Null hypothesis cannot be rejected	Moving to nest clade
2-4	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation
2-5	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation
3-1	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation
3-3	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation
Total clade	1-19NO	异域片段化 Allopatric fragmentation

明其起源较晚; Clade-III 的 4 个单倍型分别固定在云南中部的昆明和景东居群及四川西部的冕宁居群。显然, 不管从系统树的结果, 还是从 NCA 分析结果看来, 海仙报春形成的这 3 个分支拥有隔离的地理分布。从分布图 (图 1) 中可以看出, 各个分支在冰期可能存在各自的避难所, NCA 结果支持这一推断: 隔离分化是主要的分歧模式, 即在各分支存在不同的避难所。

植物居群空间上的隔离, 突变、环境因子造成的选择差异, 随机遗传漂变以及基因流的隔离等都能导致居群遗传结构的时空异质性, 从而促进居群的分化 (Jacquemyn 等, 2004)。我们的研

究结果表明, 在海仙报春分布范围内, 居群间的遗传分化水平很高 ($G_{ST} = 0.916$), 同样, 分子变异分析 (AMOVA) 的结果表明, 居群间的遗传变异为 99.08%, $F_{ST} = 0.99077$ ($P < 0.001$), 而居群内平均遗传多样性 H_s 值 (0.078) 较低。可以看出海仙报春现有的分布特征为: 居群间具有较高的遗传多样性, 而居群内的遗传多样性较低。这种分布模式与大多数温带植物在间冰期与冰期的扩张现象不符, 后者是分享同一个避难所或来自同一避难所的居群表现出较低的居群间及居群内遗传多样性, 并且单倍型组成较单一 (Newton 等, 1999; Petit 等, 2003; Zhang 等, 2005)。

或者是在避难所的居群和冰期后扩散的居群的遗传多样性不同,由于奠基者效应和瓶颈效应使冰期后扩散形成的居群的遗传多样性变低(Ibrahim等,1996;Avise,2000;Hewitt,1996,2000)。显然,在我们的研究中并未出现上述现象,在NCA分析推断形成现有分布格局的主要原因是异域片段化,即各居群间的基因交流受限。海仙报春的基因流主要有两方面,种子流和花粉流。种子缺乏长距离传播的能力,而花粉流主要通过熊蜂等昆虫进行传粉。叶绿体DNA在海仙报春中为种子传播,居群间的平均基因流为0.08,表明不同居群间的基因交流很少。造成当前这种居群间很低的基因流和很高的遗传分化现象的主要原因可能是由于其特殊的湿地生境,种子传播的距离相对有限,而花粉传播能力较低,加之居群间的地理隔离和生境片段化进一步阻碍了居群间的基因交流(Slatkin,1985;Koch等,2006;Ehrich等,2007)。

位于青藏高原东南部的横断山地区的植物在第四纪冰期时,受到冰期及间冰期的影响,种群随着气候的波动在其发生地反复缩小和扩张。在冰期时由于该区域没有大范围的冰盖(李吉均等,1996;施雅风,2004),使得一些类群可以继续在其发生地生存,类似海仙报春的高山类群可能会退缩到低海拔地区渡过这个时期。然而,在横断山多数地区都存在着平行走向的山脉及被其分隔出来的河谷,对于生长在沼泽或湿地的海仙报春,这种斑块状的生境和强烈的地理隔离限制了其基因交流,加之海仙报春的花粉及种子传播在空间距离上都受限,花粉传播距离大约仅有5.4~7.2 m(Ishihama等,2006),显然难以越过横亘的高山。所以,不同的居群在退缩过程中很难融合交流形成一个共同的避难所。同样,居群在间冰期也很难在扩张的过程中进行基因交流,冰期和间冰期的不断反复,导致种群反复的缩小和扩张,但是它们仍然保留着各自相对隔离的地理分布。居群的反复缩小和扩张使单倍型由于遗传漂变而随机固定在不同的居群中,即使是十分临近的居群中也是如此,遗传漂变降低了居群内的遗传多样性,而促进了居群间的遗传多样性。这种现象导致了居群在小范围内扩张和集中,从而形成了现在的分布格局(Wang等,2008;

Meng等,2008;Zhang等,2005)。

对海仙报春谱系地理学的研究表明,该种植物在冰期可能存在多个地理隔离的避难所,并没有表现出大多数温带植物在第四纪冰期所经历过的种群集体扩张和迁移的现象。由于横断山地区特殊的、复杂的地理环境,如平行的山脉及山谷形成的天然屏障,阻隔了种群的基因交流及迁移,形成了海仙报春的现代分布。本研究对海仙报春在横断山区的现代分布格局形成的历史成因进行了讨论,为更好的了解第四纪冰期对横断山地区植物区系格局的形成及冰期后植物居群的迁移的影响,还需对更多的类群开展研究。

致谢 岳学坤硕士为本研究提供了实验材料;张永洪博士在数据分析和论文写作给予的帮助;查红光博士在实验中指导和关心;岳亮亮、徐波、李国栋、王晓雄、陈林阳等同学给予帮助和建议。

〔参 考 文 献〕

- 王献溥,刘玉凯,1994.生物多样性的理论与实践[M].北京:中国环境科学出版社
- 刘淑珍,柴宗新,陈继良,1986.横断山北段第四纪冰川作用[A].横断山考察专集(二)[M].北京:北京科技出版社
- 李吉均,冯兆东,周尚哲,1996.横断山第四纪冰川作用遗迹[A].横断山冰川[M].北京:科学出版社
- 吴征镒,1980.中国植被[M].北京:科学出版社
- 吴征镒,1987.西藏植物区系的起源及其演化[A].西藏植物志(第5卷)[M].北京:科学出版社
- 施雅风,李吉均,李炳元,1998.青藏高原晚新生代隆起与环境变化[M].广州:广东科学技术出版社
- Avise JC, 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species [M]. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press
- Bartish IV, Kadereit JW, Comes HP, 2006. Late Quaternary history of *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) inferred from chalcone synthase intron (*Chsi*) sequences and chloroplast DNA variation [J]. *Molecular Ecology*, **15**: 4065—4083
- Beheregaray LB, 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere [J]. *Molecular Ecology*, **17** (17): 3754—3774
- Boufford DE, van Dijk PP, 2004. Mountains of southwest China [A]. In: Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M *et al.*, eds, Hotspot Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Ecoregions (2nd) [M]. Cemex, Mexico, 159—164
- Chen SY, Wu GL, Zhang DJ *et al.*, 2008. Potential refugium on the Qinghai-Tibet Plateau revealed by the chloroplast DNA phylogeography of the alpine species *Metagentiana striata* (Gentianaceae)

- [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **157**: 125—140
- Cheng YP, Hwang SY, Lin TP, 2005. Potential refugia in Taiwan revealed by the phylogeographical study of *Castanopsis carlesii* Hayata (Fagaceae) [J]. *Molecular Ecology*, **14**: 2075—2085
- Clement M, Posada D, Crandall KA, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. *Molecular Ecology*, **9**: 1657—1660
- Crandall KA, Templeton AR, 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction [J]. *Genetics*, **134** (3): 959
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Ehrich D, Gaudeul M, Assefa A *et al.*, 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains [J]. *Molecular Ecology*, **16**: 2542—2559
- Excoffier LP, Laval G, Schneider S, 2006. Arlequin 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis [M]. Switzerland: Institute of Zoology, University of Berne
- Fu YX, Li WH, 1993. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. *Genetics*, **133**: 693—709
- Fujii N, Tomaru N, Okuyama K *et al.*, 2002. Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan [J]. *Plant Systematics and Evolution*, **232**: 21—33
- Hewitt GM, 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**: 247—276
- Hewitt GM, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature*, **405**: 907—913
- Ibrahim KM, Nichols RA, Hewitt GM, 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion [J]. *Heredity*, **77**: 282—291
- Ikeda H, Setoguchi H, 2007. Phylogeography and refugia of the Japanese endemic alpine plant, *Phyllodoce nipponica* M. (Ericaceae) [J]. *Journal of Biogeography*, **34**: 169—176
- Ishihama F, Ueno S, Tsumura Y *et al.*, 2006. Effects of density and floral morph on pollen flow and seed reproduction of an endangered heterostylous herb, *Primula sieboldii* [J]. *Journal Ecology*, **94**: 846—855
- Jacquemyn H, Honnay O, Galbusera P *et al.*, 2004. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape [J]. *Molecular Ecology*, **13**: 211—219
- Koch MA, Kiefer C, Ehrich D *et al.*, 2006. Three times out of Asia Minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae) [J]. *Molecular Ecology*, **15**: 825—839
- Li XW (李锡文), Li J (李捷), 1993. A preliminary floristics study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **15**: 217—231
- Liu JQ, Wang YJ, Wang AL *et al.*, 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia - Cremanthodium - Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**: 31—49
- Meng L, Yang R, Abbott RJ *et al.*, 2007. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands [J]. *Molecular Ecology*, **16** (19): 4128—4137
- Meng LH (孟丽华), Yang HL (杨慧玲), Wang YJ (王玉金), 2008. Phylogeography of *Hippophae neurocarpa* (Elaeagnaceae) inferred from the chloroplast DNA *trnL-F* sequence variation [J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), **46**: 32—40
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics* [M]. New York: Columbia University Press
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM *et al.*, 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**: 140—145
- Okaura T, Harada K, 2002. Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume) [J]. *Heredity*, **88**: 322—329
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL *et al.*, 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity [J]. *Science*, **300**: 1563—1565
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR, 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes [J]. *Molecular Ecology*, **9** (4): 487—488
- Pons O, Petit RJ, 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. *Genetics*, **144**: 1237—1245
- Raymond M, Rousset F, 1995. An exact test for population differentiation [J]. *Evolution*, **49**: 1280—1283
- Rogers AR, Harpending H, 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 552—569
- Rozas J, Sanchez-DeI Barrie JC, Messeguer X *et al.*, 2003. DNASP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, **19**: 2496—2497
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM *et al.*, 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Molecular Ecology*, **7** (4): 465—474
- Shi YF (施雅风), 2004. The emergence and abandonment of the ice sheet hypothesis over the Qinghai-Xizang Plateau during the ice age [J]. *Quaternary Sciences* (第四纪研究), **24** (1): 10—18
- Slatkin M, 1985. Gene flow in natural populations [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**: 393—430
- Soltis PS, Gitzendanner MA, 1999. Molecular systematics and the conservation of rare species [J]. *Conservation Biology*, **13**: 471—483
- Sun H (孙航), 2002. Evolution of Arctic Tertiary flora in Himalayan Hengduan Mountains [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物

- 研究), **24**: 671—688
- Swofford DL, 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0b10 [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, **7**: 381—397
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF, 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequences data. III. Cladogram estimation [J]. *Genetics*, **132**: 619—633
- Templeton AR, Sing CF, 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination [J]. *Genetics*, **134**: 659—669
- Templeton AR, 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors [J]. *Molecular Ecology*, **13**: 789—809
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.*, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876—4882
- Wang WT (王文采), 1992. On some distribution patterns and some migration routes found in the Eastern Asiatic region (cont.) [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **30**: 97—117
- Wang YJ (王玉金), Li XJ (李晓娟), Hao G (郝刚) *et al.*, 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **42**: 481—499
- Wang AL, Yang MH, Liu JQ, 2005. Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trnL-F* sequences [J]. *Annals of Botany*, **96**: 489—498
- Wang YJ, Liu JQ, Mieh G, 2007. Phylogenetic origins of the Himalayan endemic *Dolomiaea*, *Diplazoptilon* and *Xanthopappus* (Asteraceae: Cardueae) based on three DNA regions [J]. *Annals of Botany*, **99**: 311—322
- Wang FY, Gong X, Hu CM *et al.*, 2008. Phylogeography of an alpine species *Primula secundiflora* inferred from the chloroplast DNA sequence variation [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **46** (1): 13—22
- Wang L, Abbott RJ, Zheng W *et al.*, 2009. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymrandrum* (Ranunculaceae) [J]. *Molecular Ecology*, **18** (4): 709—721
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, **38**: 1358—1370
- Wu CY (吴征镒), 1979. The regionalization of Chinese flora [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **1**: 1—22
- Wu CY, 1988. Hengduan Mountains flora and its significance [J]. *Journal of Japanese Botany*, **63**: 297—311
- Zhang Q, Chiang TY, George M *et al.*, 2005. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation [J]. *Molecular Ecology*, **14**: 3513—3524
- Zhang DC, Boufford DE, Ree RH *et al.*, 2009. The 29° N latitudinal line: an important division in the Hengduan Mountains, a biodiversity hotspot in southwest China [J]. *Nordic Journal of Botany*, **27**: 405—412
- Zhang DC, Sun H, 2010. Elevational pattern of seed plant species richness in the Hengduan Mountains, Southwest China: Area and Climate [A]. In: Spehn EM, Körner C, eds. Data Mining for Global Trends in Mountain Biodiversity [M]. Boca Raton: CRC Press